# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

26. August 1999 (26.08.99)

WO 99/42088

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/01153

**A2** 

- (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Februar 1999 (23.02.99)
- (30) Prioritätsdaten:

A61K 31/00

198 07 426.3

23. Februar 1998 (23.02.98)

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): OTO-GENE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Vor dem Kreuzberg 17, D-72070 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖWENHEIM, Hubert [DE/DE]; Philipp-von-Heck-Strasse 1, D-72076 Tübingen
- (74) Anwalt: RUFF, BEIER, SCHÖNDORF UND MÜTSCHELE; Willy-Brandt-Strasse 28, D-70173 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK. ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: METHOD FOR THE TREATMENT OF DISEASES OR DISORDERS OF THE INNER EAR
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON ERKRANKUNGEN ODER STÖRUNGEN DES INNENOHRS

#### (57) Abstract

The invention relates to a method for treating diseases or disorders of the inner ear which are related to damage to or the destruction of sensory cells of the inner ear. According to said method at least one active ingredient is used for the regeneration of the sensory cells which at least partly inhibits or eliminates the inhibiting action of a cell cycle inhibitor present in the inner ear, and regeneration of the sensory cells of the inner ear is preferably achieved by stimulating the proliferation of supporting cells. The sensory cells of the inner ear are the hair sensory cells. Potential cell cycle inhibitors are cyclin-dependent kinase inhibitors and particularly the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1.

#### (57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen, wird zur Regeneration der Sinneszellen mindestens ein Wirkstoff eingesetzt, der mindestens einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhibierenden Wirkung mindestens teilweise hemmt oder ausschaltet. Die Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs erfolgt bei diesem Verfahren vorzugsweise durch Stimulation der Proliferation von Stützzellen. Bei den Sinneszellen des Innenohrs handelt es sich um die sogenannten Haarsinneszellen. Als Zellzyklus-Inhibitoren kommen Zyklinkinase-Inhibitoren wie insbesondere der Zyklinkinase-Inhibitor P27Kip1 in Frage.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| PCT veröffentlichen.  AL Albanien ES Spanien AM Armenien FI Finnland AT Österreich FR Frankreich AU Australien GA Gabun AZ Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich BA Bosnien-Herzegowina GE Georgien BB Barbados GH Ghana BE Belgien GN Guinea BF Burkina Faso GR Griechenland BG Bulgarien HU Ungam BJ Benin IE Irland BR Brasilien IL Israel BY Belarus IS Island CA Kanada IT Italien CF Zentralafrikanische Republik JP Japan CG Kongo KE Kenia CH Schweiz KG Kirgisistan CH Schweiz KG KG Kirgisistan CM Kamerun KR Republik Korea CM Kamerun CN China KR Republik Korea CU Kuba CZ Tschechische Republik LC St. Lucia DE Deutschland DK Dänemark LK Sri Lanka LE Estland LR Liberia | LS Lesotho LT Litauen LU Luxemburg LV Lettland MC Monaco MD Republik Moldau MG Madagaskar MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien ML Mali MN Mongolei MR Mauretanien MW Malawi MX Mexiko NE Niger NL Niederlande NO Norwegen NZ Neusceland PL Polen PT Portugal RO Rumänien RU Russische Föderation SD Sudan SE Schweden SG Singapur | SI Slowenien SK Slowakei SN Senegal SZ Swasiland TD Tschad TG Togo TJ Tadschikistan TM Turkmenistan TR Türkei TT Trinidad und Tobago UA Ukraine UG Uganda US Vereinigte Staaten von Amerika UZ Usbekistan VN Vietnam YU Jugoslawien ZW Zimbabwe |
|--|---|---|
|--|---|---|

# <u>Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen</u> <u>oder Störungen des Innenohrs</u>

#### Beschreibung

10

5

Die Erfindung betrifft zunächst ein Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen.

15

Das Innenohr des Menschen und anderer Säugetiere kann entweder von vorneherein durch einen genetischen Defekt oder später durch äußere Einflüsse irreversibel geschädigt sein. Bei den genannten äußeren Einflüssen kann es sich beispiels-20 weise um Schalltraumata oder um toxische oder hypoxische Einflüsse handeln. Diese Schädigungen können in Funktionsstörungen oder Funktionsausfällen der im Innenohr lokalisierten Sinne, insbesondere des Hörens, resultieren. Bei diesen Funktionsstörungen ist insbesondere eine Reduktion oder ein 25 Schwinden des Hörvermögens zu nennen. Schätzungsweise dürften in Deutschland ca. 12 Millionen Menschen an einer sogenannten Innenohrschwerhörigkeit leiden, die auf die genannten Pathomechanismen zurückzuführen ist. Als Ursache für den teilweisen oder vollständigen Verlust des Hörvermögens kommt hier 30 neben der Degeneration von sensorischen Neuronen und Schädigungen der sogenannten Stria vascularis des Innenohrs, insbesondere eine Schädigung oder Zerstörung der Sinneszellen des Innenohrs und damit des Hörorgans in Frage.

Bei einem Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen im Zusammenhang stehen, ist zu berücksichtigen, daß in den hochdifferenzierten Sinnesepithelien im Innenohr des Menschen und anderer Säuger irreversibel geschädigte und damit verlorene Zellen nicht mehr regeneriert werden können. Ein teilweiser oder vollständiger Hörverlust aufgrund Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs bleibt damit in der Regel irreversibel. Hier unterscheiden sich die Sinnesepithelien des Innenohrs grundlegend von anderen Geweben, in denen abgestorbene Zellen durch die Teilung von Ersatzzellen und deren anschließende Ausdifferenzierung schnell ersetzt werden können.

- Interessanterweise ist bei anderen Wirbeltierklassen wie beispielsweise den Vögeln im Gegensatz zu der Situation beim Menschen eine Regeneration abgestorbener Sinneszellen im Innenohr möglich. Hier werden die nach einer Schädigung abgestorbenen Sinneszellen durch sogenannte Stützzellen, die im Epithel unterhalb der Sinneszellen angeordnet sind, ersetzt. Dies erfolgt durch Teilung der Stützzellen und anschließende Ausdifferenzierung, wobei aus einer Stützzelle eine neue Stützzelle und eine Sinneszelle hervorgeht.
- Die Entdeckung der Regeneration von Sinneszellen in der Cochlea des Vogels hat in den letzten Jahren zu dem Versuch geführt, Untersuchungsergebnisse beim Vogel auf Säugetiere und damit letztendlich auf den Menschen zu übertragen. Dies erschien unter anderem deshalb erfolgversprechend, da die Cochlea des Vogels und die Cochlea von Säugern zellbiologische Gemeinsamkeiten aufweisen. Sowohl das Sinnesepithel der Vogelcochlea als auch das Sinnesepithel der Säugercochlea sind nämlich postmitotisch, das heißt die in den Sinnesepithelien vorhandenen Sinneszellen werden nur während eines

ganz bestimmten Zeitabschnitts in der embryonalen Entwicklung ausgebildet. Danach finden normalerweise keine weiteren Zellteilungen statt. Diese grundsätzliche Gemeinsamkeit macht aber die Erscheinung, daß sich im vestibulären Sinnesepithel des Vogels während seines gesamten Lebens Zellteilungen nachweisen lassen, beim Menschen jedoch nicht, schwer verständlich.

Da beim Vogel erkannt wurde, daß sogenannte Wachstumsfaktoren in der Vogelcochlea eine erhöhte Proliferationsrate hervor-10 rufen können, wurden solche Wachstumsfaktoren auch in der Cochlea des Säugers eingesetzt. Es ließ sich jedoch keine reproduzierbare Wirkung nachweisen. Dies legt den Schluß nahe, daß trotz einer grundsätzlichen zellbiologischen Gemeinsamkeit, andere signifikante Unterschiede zwischen Vogelcochlea und Säugercochlea vorhanden sein müssen. Diese könnten darin liegen, daß die Stützzellen der Vogelcochlea zwar wie beim Säuger postmitotisch sind, den Zellzyklus jedoch nur vorübergehend verlassen haben. Sie können dann beim Auftreten eines entsprechenden Signals wieder in den Zellzyklus eintreten. Derartige Stützzellen können als quiescent, das heißt in Wartestellung stehend bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu können die Stützzellen des Säugers eine sehr hohe und spezielle Differenzierung durchlaufen und 25 damit den Zellzyklus irreversibel verlassen haben. Dementsprechend wären sie als terminal differenziert zu bezeichnen und beispielsweise den Neuronen vergleichbar. Dies kann für die Stützzellen des Säugers gelten, die als sogenannte Pillarzellen oder Deiterszellen bezeichnet werden. Solche 30 Erklärungsmodelle für zellbiologische Unterschiede zwischen Vogelcochlea und Säugercochlea werden derzeit zum Anlaß genommen, die Regeneration der Sinneszellen beim Vogel noch detaillierter zu untersuchen, um später weitere dort erhaltene Ergebnisse auf den Säuger übertragen zu können.

Die Erfindung stellt sich demgegenüber die Aufgabe, einen neuen Ansatz zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung der Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen, zu finden. Hierbei soll weniger versucht werden, an anderen Wirbeltieren als den Säugern erhaltene Ergebnisse auf Säuger und insbesondere den Menschen zu übertragen, als vielmehr einen Wirkmechanismus und entsprechende Wirkstoffe zur Verfügung zu stellen, die direkt in die Zellvorgänge beim Säuger eingreifen und letztlich in einer Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs resultieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruch 1 bzw. durch die Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 2 und 3. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 4 bis 21 dargestellt. Der Inhalt sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

20

25

10

15

Das Verfahren der eingangs genannten Art ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein im Innenohr vorhandener sogenannter Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhibierenden Wirkung durch (mindestens) einen Wirkstoff mindestens teilweise gehemmt oder ausgeschaltet wird. Dies resultiert in einer Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs. Dieses Verfahren umfaßt patentrechtlich auch die Verwendung eines Wirkstoffs, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen oder 30 auszuschalten, entweder direkt zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs oder indirekt zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, wobei diese Erkrankungen/Störungen mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen.

Die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren resultierende Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs erfolgt vorzugsweise durch eine Stimulation der Proliferation von Stützzellen des Innenohrs, das heißt der ebenfalls im Sinnesepithel, meist zwischen und unterhalb der Sinneszellen angeordneten Stützzellen. Da einer oder mehrere Zellzyklus-Inhibitoren in den Stützzellen des Innenohrs zu finden sind, kann durch die Hemmung oder Ausschaltung deren inhibierender Wirkung durch einen geeigneten Wirkstoff die Zellteilung der Stützzellen initiiert und damit eine Grundvoraussetzung für die Schaffung von Ersatzzellen für abgestorbene Sinneszellen geschaffen werden. Die aus der Teilung der Stützzellen hervorgehenden Zellen können dann mindestens teilweise zu funktionsfähigen Sinneszellen ausdifferenzieren.

Bei den bisher genannten Sinneszellen des Innenohrs handelt es sich vorzugsweise um die sogenannten Haarsinneszellen oder 20 kurz Haarzellen, die an ihrem oberen Ende haarähnliche Fortsätze, die sogenannten Stereozilien oder Sinneshärchen aufweisen. Diese Haarzellen befinden sich auf der Basilarmembran im sogenannten Corti-Organ und bilden in Form sogenannter äußerer Haarzellen und sogenannter innerer Haarzellen die eigentlichen Rezeptorzellen für die Schalltransduktion im Innenohr. Interessant für eine Regeneration sind sowohl die inneren als auch die äußeren Haarzellen, wobei eine Regeneration der äußeren Haarzellen aufgrund deren größerer Empfindlichkeit ein besonderes Anwendungsgebiet der Erfindung 30 darstellt. Diejenigen Stützzellen, die den inneren oder äußeren Haarsinneszellen anatomisch besonders gut zugeordnet sind, kommen für einen Einsatz des erfindungsgemäß verwendeten Wirkstoffs in besonderer Weise in Frage. So befinden sich

neben den äußeren Haarsinneszellen als Stützzellen die sogenannten Hensenzellen, und unterhalb der äußeren Haarsinneszellen die sogenannten Deiterszellen und die "äußeren" Pillarzellen. Diese Hensenzellen, Deiterszellen und äußeren Pillarzellen sind dementsprechend als Ersatzzellen für die äußeren Haarsinneszellen besonders geeignet. In entsprechender Weise befinden sich neben und unterhalb der inneren Haarsinneszellen die sogenannten inneren Sulcuszellen als Stützzellen und unterhalb der inneren Haarsinneszellen auch die inneren Pillarzellen, die dementsprechend beide als 10 Ersatzzellen für die inneren Haarsinneszellen in Betracht kommen. Dementsprechend kann ggf. eine Regeneration von inneren oder äußeren Haarzellen selektiv initiiert und beeinflußt werden. Hier kann auch auf die einschlägigen Fachbücher und Fachartikel über den Hörvorgang bei Säugern, insbesondere beim Menschen verwiesen werden. Die Regeneration der an der Schalltransduktion im Innenohr beteiligten Haarsinneszellen zur Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit bei einer vorliegenden Schädigung dieser Sinneszellen stellt das Hauptanwendungsgebiet der vorliegenden Erfindung dar. 20

Bei den Zellzyklus-Inhibitoren, die erfindungsgemäß in ihrer inhibierenden Wirkung gehemmt oder ausgeschaltet werden, kann es sich grundsätzlich um verschiedene physiologische Stoffe, insbesondere Proteine handeln, die verhindern, daß die Zelle den normalen Zellzyklus einschließlich Zellteilung durchlaufen kann. Vorzugsweise handelt es sich um die sogenannten cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs), also um Zyklin-kinase-Inhibitoren. Von diesen ist bekannt, daß sie während der Entwicklung eines Organismus bei der Entstehung von terminal differenzierten Zellen verstärkt exprimiert werden und auf diese Weise einen Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus verhindern. Dies würde auch den Verlust der Teilungsfähigkeit solcher Zellen mit verstärkter Exprimierung

von Zyklinkinase-Inhibitoren erklären. Zellzyklus-Inhibitoren und dabei insbesondere Zyklinkinase-Inhibitoren der sogenannten CIP/KIP-Familie können selektiv in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Als bevorzugte Zyklinkinase-Inhibitoren sind hier insbesondere die als p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> bezeichneten Proteine zu nennen, wobei es sich erfindungsgemäß vorzugsweise um den Zyklinkinase-Inhibitor p27K1p1 handelt. Aufgrund der selektiven Exprimierung solcher Inhibitoren und der daraus resultierenden unterschiedlichen Expressionsmuster kann die Erfindung zur selektiven Beeinflussung des Zellzyklus in einem bestimmten Zelltyp eingesetzt werden. Wird beispielsweise in einem bestimmten Zelltyp, wie beispielsweise den Stützzellen im Sinnesepithel des Innenohrs, selektiv oder doch zumindest mit einem beträchtlichen Anteil p27K1pl exprimiert, kann durch einen speziell auf diesen Inhibitor abgestellten Wirkstoff, dessen inhibierende Wirkung ausgeschaltet und damit die Proliferation der Stützzellen initiiert bzw. stimuliert werden. Über eine Ausdifferenzierung mindestens eines Teils der aus der Teilung der Stützzellen hervorgegangenen Zellen wird dann die Regeneration der Sinneszellen bewirkt.

Wie aus den bisherigen Ausführungen bereits hervorgeht, handelt es sich bei der Erkrankung oder Störung des Innenohrs
erfindungsgemäß insbesondere um eine sogenannten Innenohrschwerhörigkeit. Diese steht mit der bereits erläuterten
Schädigung oder Zerstörung der Haarsinneszellen im Innenohr
im Zusammenhang.

30 Bei dem erfindungsgemäß einsetzbaren Wirkstoff, der den Zellzyklus-Inhibitor wiederum in seiner inhibierenden Wirkung hemmt oder ausschaltet, handelt es sich vorzugsweise um eine Substanz, die, üblicherweise intrazellulär, direkt oder indirekt auf den Inhibitor, das heißt üblicherweise ein

Peptid oder Protein einwirkt. Dabei kann der Wirkstoff vorzugsweise als Peptid oder Protein vorliegen, das mit dem Inhibitor eine Peptid-Peptid- oder Protein-Protein-Wechselwirkung eingeht. Das wäre dann der Fall einer "direkten" Beeinflussung der Funktion des Inhibitors. Wenn als Wirkstoff ein Nukleinsäuremolekül verwendet wird, das für die Aminosäuresequenz eines oben genannten Peptids/Proteins kodiert, kann man von einer "indirekten" Beeinflussung sprechen, da zunächst das kodierende Nukleinsäuremolekül in die entsprechende Zelle eingeschleust und anschließend das (direkt als 10 Wirkstoff dienende) Peptid-/Proteinmolekül exprimiert wird. Bei dem genannten Nukleinsäuremolekül kann es sich insbesondere um ein rekombiniertes Nukleinsäuremolekül handeln. Das Nukleinsäuremolekül kann grundsätzlich ein DNA-Molekül, ein cDNA-Molekül oder ein RNA-Molekül sein. 15

Ein weiterer Wirkstoff, der nach der Erfindung bevorzugt einsetzbar ist, ist ein Nukleinsäuremolekül, bei dem man sich die sogenannte Antisense-Technik zunutze macht. Bei dieser dem Fachmann grundsätzlich bekannten Technik wird üblicher-20 weise eine RNA verwendet, die zur RNA des normalen (physiologischen) Gens komplementär ist. Diese komplementäre RNA nennt man Antisense-RNA. Die Antisense-RNA kann die Synthese des zu dem Gen gehörenden Proteinprodukts verhindern. Dies bedeutet im Fall der Erfindung, daß ein Nukleinsäuremolekül, 25 beispielsweise die Antisense-RNA selbst oder die DNA, bei deren Transkription die Antisense-RNA entsteht, zur Hemmung oder Ausschaltung der inhibierenden Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors in den Organismus bzw. die Zelle eingebracht wird. Dieses Einbringen kann vorzugsweise mit Hilfe von Lipidverbindungen geschehen, die zusätzlich virale Komponenten zum besseren Andocken und Eindringen des Nukleinsäuremoleküls in die Zelle tragen.

Wie geschildert kann der Wirkstoff bei der Erfindung eine unmittelbare Wechselwirkung, vorzugsweise eine Peptid-Peptidoder Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Zellzyklus-Inhibitor eingehen. Der Wirkstoff kann jedoch auch mittelbar die inhibierende Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors hemmen oder ausschalten, indem er mit einem physiologischen Wechselwirkungspartner des Zellzyklus-Inhibitors mindestens genauso gut oder vorzugsweise besser wechselwirkt als der Zellzyklus-Inhibitor selbst. Auf diese Weise wird dann verhindert, daß der Zellzyklus-Inhibitor seine physiologische (inhibierende) Wirkung entfalten kann.

So ist es beispielsweise im Falle des Zyklinkinase-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> bekannt, daß dieser zusammen mit der zyklinabhängigen Kinase CDK2 und dem Zyklin A einen Proteinkomplex ausbildet. Dabei existieren bestimmte Stellen, an denen zwischen dem p27Kip1 und CDK2 bzw. Zyklin A Peptid-Peptid-Wechselwirkungen stattfinden. So wurde beispielsweise eine Bindungsstelle sehr hoher Affinität zwischen p27Kipl und Zyklin A identifiziert und mehrere weniger starke Bindungsstellen zwischen p27Kip1 und Zyklin A bzw. p27Kip1 und CDK2. Greift man nun eine der Bindungsstellen heraus, an denen keine Bindung/Interaktion mit hoher oder sehr hoher Affinität vorliegt, so kann ein Wirkstoff, vorzugsweise in Form eines weiteren Peptids/Proteins ausgewählt oder entwickelt werden, der mit einem der beiden Wechselwirkungspartner an der betreffenden Bindungsstelle eine Bindung/Interaktion mindestens gleich hoher oder vorzugsweise höherer Affinität eingeht. Dadurch wird dann die übliche physiologische Wechselwirkung gehemmt oder verhin-30 dert, da die entsprechende Bindungsstelle für den physiologischen Wechselwirkungspartner blockiert ist.

So kann beispielsweise für eine Bindungsstelle zwischen p27<sup>Kipl</sup> und Zyklin A, aber auch CDK2, eine optimierte Pep-

tidstruktur oder optimierte Aminosäuresequenz für die Aminosäuresequenz des p27Kipl an dieser Stelle entwickelt werden, die dann an die entsprechende Sequenz des Zyklin A bzw. CDK2 an dieser Stelle mit besserer, das heißt höherer Affinität bindet. Eine derartige optimierte Peptidstruktur umfaßt beispiels- und vorzugsweise bis zu 15 Aminosäuren und kann dann direkt in die Zelle eingebracht oder vorzugsweise durch ein künstlich eingebrachtes Gen intrazellulär exprimiert werden. Durch die hohe Affinität eines solchen Peptids wird dann die 10 Wechselwirkung der physiologischen Peptidpartner gestört und die Ausbildung des Peptidkomplexes, auf der die inhibierende Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors beruht, verhindert. Auf diese Weise sorgt dann der Wirkstoff für eine mindestens teilweise Hemmung oder eine vollständige Ausschaltung der inhibierenden Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors. Durch diesen 15 Verfahrensansatz der Erfindung muß die Konzentration des Wirkstoffs, insbesondere des Peptids/Proteins mit der entsprechenden Aminosäuresequenz in der Zelle nur etwa gleich hoch sein wie die entsprechende Konzentration des Zellzyklus-Inhibitors, der in seiner Wirkung gehemmt oder ausgeschaltet 20 werden soll. Da derartige Konzentrationen, beispielsweise von p27Kip1 in der Größenordnung von ca. 10 nM/l liegen und etwa 1000 bis 10000 Molekülen pro Zelle entsprechen, können bereits sehr niedrige Konzentrationen für die Durchführung der Erfindung ausreichen. Wichtig ist ebenfalls, daß zum Erreichen einer solchen Konzentration mit Hilfe gentherapeutischer Methoden bereits das Einschleusen einer einzigen Kopie einer DNA, die für die entsprechende Aminosäuresequenz kodiert, pro Zelle ausreicht. Dies stellt gegenüber anderen Methoden, die mit viel höheren Konzentrationen oder einer 30 größeren Vielzahl von DNA-Kopien arbeiten müssen, einen entscheidenden Vorteil dar.

In Weiterbildung kann das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt werden, daß der Wirkstoff in Form eines sogenannten Vektors oder Vehikels vorliegt, wobei dieser Vektor oder dieses Vehikel mindestens eines der bereits beschriebe-5 nen Nukleinsäuremoleküle trägt. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein Nukleinsäuremolekül, das für die Aminosäuresequenz eines als Wirkstoff dienenden Peptids oder Proteins kodiert. Bei den genannten Vektoren kann es sich um die üblichen viralen und nicht-viralen Vektoren handeln, wie sie dem Fachmann bekannt sind. So können in üblicherweise Retroviren, Adenoviren oder adeno-assoziierte Viren als virale Vektoren eingesetzt werden. Bei nicht-viralen Vektoren ist bekanntermaßen keine virale DNA beteiligt, so daß hier grundsätzlich eine "nackte" DNA in eine Zelle eingebracht werden kann. Vorzugsweise werden derartige Nukleinsäuremoleküle jedoch üblicherweise in sogenannte Liposomen oder Lipoplexe verpackt sein und in dieser Form in den Organismus und die Zelle eingebracht werden. Der Einsatz von nicht-viralen Vektoren bzw. Lipoplexen ist grundsätzlich bevorzugt, da virale Vektoren einige, dem Fachmann bekannte Nachteile aufweisen. Aufgrund der soeben geschilderten Einsatzmöglichkeiten der Erfindung kann hier häufig ohne Verwendung viraler Vektoren gearbeitet werden, da die Effektivität der verwendeten Wirkstoffe selbst sehr hoch ist und dementsprechend mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden kann.

Bei der Erfindung wird der verwendete Wirkstoff vorzugsweise in einer therapeutisch wirksamen Menge eingesetzt. Dieser kann in üblicher Weise auf das zu behandelnde Subjekt abgestellt sein, wobei u.a. bekannte pharmazeutische Zusatzstoffe zum Einsatz kommen können. In Weiterbildung kann der verwendete Wirkstoff und dementsprechend auch das erfindungsgemäße Verfahren zur lokalen Applikation vorgesehen sein. Damit können mögliche Nachteile einer systemischen Applikation

20

25

vermieden werden. Der Zielort des erfindungsgemäßen Verfahrens, nämlich das Innenohr, ist für eine lokale Applikation in besonderem Maße geeignet. So kann der Wirkstoff im vorliegenden Fall in den sogenannten Perilymphraum des Innenohrs des Säugers, insbesondere des Menschen eingebracht werden. Hier handelt es sich um einen kleinen Flüssigkeitsraum mit sehr langsamer Austauschgeschwindigkeit, der einer therapeutischen Intervention vom Mittelohr her, beispielsweise über die Membran des runden Fensters, zugänglich ist. Dieser Perilymphraum hat ein Volumen von nur etwa 20 Mikrolitern und steht zudem in direktem Kontakt mit den Zellen des Corti-Organs. Damit ist ein direktes Einwirken des Wirkstoffes auf das Sinnesepithel mit seinen Haarzellen und Stützzellen gewährleistet.

15

10

Weiter umfaßt die Erfindung den Wirkstoff selbst, dessen Verwendung in dem bereits beschriebenen Verfahren ausführlich dargestellt ist. Auf den Inhalt und Wortlaut der Ansprüche 22 bis 27 wird Bezug genommen. Dieser Wirkstoff ist zur Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs, insbesondere der Haarsinneszellen des Innenohrs ausgebildet und in der Lage, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner (inhibierenden) Wirkung mindestens teilweise zu hemmen oder auszuschalten. Bei dem Zellzyklus-Inhibitor handelt es sich vorzugsweise um einen Zyklinkinase-Inhibitor, 25 insbesondere den Zyklinkinase-Inhibitor p27Kip1. Bezüglich der genauen und bevorzugten Eigenschaften des Wirkstoffs wird auf die bisherigen Ausführungen Bezug genommen und verwiesen. Wie geschildert kann es sich hierbei vorzugsweise um minde-30 stens ein Peptid/Protein oder um mindestens ein Nukleinsäuremolekül handeln, wobei letzteres vorzugsweise eine Antisense-DNA oder Antisense-RNA ist oder vorzugsweise für ein entsprechendes als Wirkstoff einsetzbares Peptid/Protein

kodiert. Bei dem Nukleinsäuremolelkül kann es sich um ein DNA-Molekül, ein cDNA-Molekül oder ein RNA-Molekül handeln. Insbesondere das Nukleinsäuremolekül wird mit Hilfe eines geeigneten Vektors oder Vehikels in den Organismus bzw. die Zelle eingebracht, wobei es sich um die beschriebenen viralen oder nicht-viralen Vektoren bzw. um in Liposomen/Lipoplexen verpackte Nukleinsäuremoleküle handeln kann.

Schließlich umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusam0 mensetzung oder ein Medikament, das mindestens einen Wirkstoff, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen
sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen
oder auszuschalten, in einer wirksamen Menge sowie üblicherweise einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält. Bezüglich des in der Zusammensetzung bzw. dem Medikament enthaltenen Wirkstoffs wird ausdrücklich auf die bisherigen Ausführungen Bezug genommen. Auf den Inhalt der Ansprüche 28 und 29
wird ausdrücklich verwiesen.

Die beschriebenen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung einer bevorzugten Ausführungsform in Verbindung mit den Unteransprüchen, dem Beispiel und der Zeichnung. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils einzeln für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

#### In der Zeichnung zeigt:

Figur 1 die elektronenmikroskopische Aufnahme einer in
Kernteilung befindlichen Zelle im sensorischen

Epithel des Corti-Organs einer sogenannten p27<sup>Kip</sup>Knockout-Maus.

### **Beispiel**

Für den Versuch wird eine sogenannte p27<sup>Kip1</sup>-Knockout-Maus (p27<sup>-</sup>/\_) verwendet, das heißt eine Maus, der das Gen zur Expression des Proteins p27<sup>Kip1</sup> fehlt. Dementsprechend kann in einer solchen Maus p27<sup>Kip1</sup> seine Zellzyklus-inhibierende Wirkung per se nicht entfalten.

10 Von einer solchen p27<sup>Kip1</sup>-Knockout-Maus wird am siebten Tag nach der Geburt (postnataler Tag 7) das Cortische Organ entnommen und in üblicher Weise für eine elektronenmikroskopische Untersuchung derart präpariert, daß das sensorische Epithel des Cortischen Organs zu sehen ist.

15

Das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist in Figur 1 dargestellt. In dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme ist zu erkennen, daß zwischen zwei links oben bzw. rechts unten befindlichen inneren Haarzellen, von denen die schwarz umrandeten Zellkerne links oben (vollständig) und rechts unten (teilweise) zu erkennen sind, eine in Kernteilung (Mitose) befindliche Zelle, das heißt eine mitotische Zelle angeordnet ist. Die Mitose ist eindeutig erkennbar am kondensierten Chromatin, der aufgelösten Kernmembran und dem Basalkörperchen. Die links oben angeordnete innere Haarzelle und das Basalkörperchen sind in der Figur zur besseren Erkennbarkeit mit englichsprachiger Beschriftung bezeichnet.

Damit ergibt sich aus Figur 1 eindeutig, daß das Fehlen des Zellzyklus-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> dazu führt, daß im Sinnesepithel des Cortischen Organs der Maus eine Zellteilung von dort angeordneten Stützzellen möglich ist. Hierbei ist noch zu erwähnen, daß es sich bei der in Figur 1 dargestellten Zellteilung nicht um eine Einzelerscheinung innerhalb des sensori-

schen Epithels des Corti-Organs handelt, sondern daß sehr viele dort befindliche Zellen eine Zellteilung und damit den Zellzyklus durchlaufen. Die in Figur 1 dargestellte Erscheinung läßt den Schluß zu, daß nicht nur eine Zellteilung, sondern nach einer Zellteilung, die den entscheidenden Schritt im Haarzellregenerationsprozess darstellt, im weiteren auch eine Differenzierung zu Haarsinneszellen und schließlich eine funktionelle Erholung der Hörfunktion des Sinnesorgans eintritt. Damit ist eine Regeneration der 10 Sinneszellen möglich. Für die Zulässigkeit dieses Schlusses spricht auch, daß bei der Knockout-Maus nicht nur eine Mitose stattfindet, sondern daß derartige Knockout-Mäuse auch mehr Haarzellen besitzen als normale Mäuse, bei denen das Protein p27Kip1 exprimiert wird. Dementsprechend resultiert die Mitose der Stützzellen auch in ausdifferenzierten Sinneszellen. Die Richtigkeit dieses Schlusses wird durch die folgenden Ergebnisse bestätigt. Bei heterozygoten Knockout-Mäusen wurde die Regeneration der Haarzellen dadurch nachgewiesen, daß in der zweiten Lebenswoche der Tiere, wenn diese die 20 Hörfunktion entwickeln, die Haarzellen durch systemische Verabreichung von Amikacin zerstört wurden. Nach weiteren zwei Wochen ohne jede Injektion wurden die Tiere getötet und ihre Cochlea untersucht. Dabei zeigten sich neu gebildete Haarzellen in der Cochlea, die durch einen, beispielsweise 25 mit dem Amikacin verabreichten, Proliferationsmarker (Bromdesoxyuridin (BrdU)) markiert sind.

Als Konsequenz daraus läßt sich nicht nur bei KnockoutMäusen, denen das Gen für p27<sup>Kip1</sup> von vornherein fehlt,
sondern auch durch eine Hemmung oder Ausschaltung des im
normalen Organismus exprimierten p27<sup>Kip1</sup>, beispielsweise mit
Hilfe eines mit dem p27<sup>Kip1</sup> oder einem seiner physiologischen Partner wechselwirkenden Peptids, mit Hilfe der für
dieses Peptid kodierenden Nukleinsäuresequenz oder mit Hilfe

einer Antisense-DNA/Antisense-RNA eine Regeneration der Sinneszellen erreichen. Dies kann auch durch eine nur teil-weise Ausschaltung der Funktion von p27<sup>Kip1</sup> geschehen, da bei den heterozygoten Mäusen ein Gen-Dosis abhängiger Effekt beobachtet wird.

# <u>Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen</u> <u>oder Störungen des Innenohrs</u>

5

20

### Patentansprüche

- 1. Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen, dadurch gekennzeichnet, daß zur Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs mindestens ein im Innenohr vorhandener sogenannter Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhibierenden Wirkung durch einen Wirkstoff mindestens teilweise gehemmt oder ausgeschaltet wird.
  - Verwendung eines Wirkstoffs, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten, zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen.
- 3. Verwendung eines Wirkstoffs, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen.
  - 4. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Regeneration

der Sinneszellen des Innenohrs durch Stimulation von Proliferation von Stützzellen des Innenohrs erfolgt.

- 5. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Sinneszellen des Innenohrs um sogenannte Haarsinneszellen handelt.
- 6. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden
  10 Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem
  Zellzyklus-Inhibitor um einen Zyklinkinase-Inhibitor
  handelt.
  - 7. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Zyklinkinase-Inhibitor
    um den Zyklinkinase-Inhibitor p27<sup>Kipl</sup> handelt.
  - 8. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung oder Störung des Innenohrs um eine Innenohrschwerhörigkeit handelt.
  - Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirkstoff um mindestens ein Peptid oder mindestens ein Protein handelt.
  - 10. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirkstoff um mindestens ein Nukleinsäuremolekül, insbesondere rekombiniertes Nukleinsäuremolekül handelt.
    - 11. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 10, dadurch ge-

kennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül für ein Peptid oder ein Protein nach Anspruch 9 kodiert.

- 12. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül ist.
- 13. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein cDNA-Molekül ist.
  - 14. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein RNA-Molekül ist.
- 15. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in Form eines sogenannten Vektors vorliegt, wobei vorzugsweise der Vektor ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 10 bis 14 trägt.
  - 16. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Vektor um einen viralen Vektor handelt.
  - 17. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Virus um ein Retrovirus, ein Adenovirus oder ein adeno-assoziiertes Virus handelt.
  - 18. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Vektor um einen nichtviralen Vektor handelt.

25

19. Verfahren oder Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein in ein Liposom oder einen Lipoplex verpacktes Nukleinsäuremolekül handelt.

5

- 20. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in einer therapeutisch wirksamen Menge eingesetzt wird.
- 10 21. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff zur lokalen Applikation vorgesehen ist.
- 22. Wirkstoff zur Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs, insbesondere der Haarsinneszellen des Innenohrs,
  dadurch gekennzeichnet, daß er in der Lage ist, einen im
  Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in
  seiner Wirkung mindestens teilweise zu hemmen oder auszuschalten.

- 23. Wirkstoff nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellzyklus-Inhibitor ein Zyklinkinase-Inhibitor, vorzugsweise der Zyklinkinase-Inhibitor p27<sup>Kipl</sup> ist.
- 25 24. Wirkstoff nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mindestens ein Peptid oder mindestens ein Protein handelt.
- 25. Wirkstoff nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeich30 net, daß es sich um mindestens ein Nukleinsäuremolekül,
  vorzugsweise ein rekombiniertes Nukleinsäuremolekül
  handelt.

- 26. Wirkstoff nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül, cDNA-Molekül oder RNA-Molekül ist.
- 5 27. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in Form eines sogenannten Vektors oder Vehikels vorliegt, wobei dieser vorzugsweise gekennzeichnet ist durch mindestens eines der Merkmale der Ansprüche 15 bis 19.

10

- 28. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Medikament, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens einen Wirkstoff, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten in einer wirksamen Menge und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.
- 29. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Medikament nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff
   20 ein Wirkstoff nach einem der Ansprüche 23 bis 27 ist.

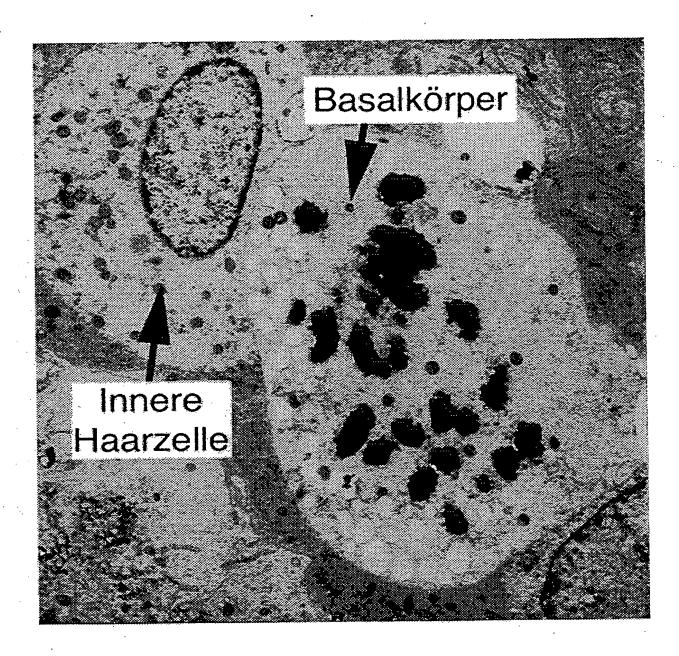


Fig. 1

#### WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

A61K 38/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/42088

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

26. August 1999 (26.08.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/01153

**A3** 

- (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Februar 1999 (23.02.99)
- (30) Prioritätsdaten:

198 07 426.3

23. Februar 1998 (23.02.98)

DE

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): OTO-GENE AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Vor dem Kreuzberg 17, D-72070 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖWENHEIM, Hubert [DE/DE]; Philipp-von-Heck-Strasse 1, D-72076 Tübingen
- (74) Anwalt: RUFF, BEIER, SCHÖNDORF UND MÜTSCHELE: Willy-Brandt-Strasse 28, D-70173 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 2. März 2000 (02.03.00)

- (54) Title: METHOD FOR THE TREATMENT OF DISEASES OR DISORDERS OF THE INNER EAR
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON ERKRANKUNGEN ODER STÖRUNGEN DES INNENOHRS

#### (57) Abstract

The invention relates to a method for treating diseases or disorders of the inner ear which are related to damage to or the destruction of sensory cells of the inner ear. According to said method at least one active ingredient is used for the regeneration of the sensory cells which at least partly inhibits or eliminates the inhibiting action of a cell cycle inhibitor present in the inner ear, and regeneration of the sensory cells of the inner ear is preferably achieved by stimulating the proliferation of supporting cells. The sensory cells of the inner ear are the hair sensory cells. Potential cell cycle inhibitors are cyclin-dependent kinase inhibitors and particularly the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1.

#### (57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen, wird zur Regeneration der Sinneszellen mindestens ein Wirkstoff eingesetzt, der mindestens einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhibierenden Wirkung mindestens teilweise hemmt oder ausschaltet. Die Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs erfolgt bei diesem Verfahren vorzugsweise durch Stimulation der Proliferation von Stützzellen. Bei den Sinneszellen des Innenohrs handelt es sich um die sogenannten Haarsinneszellen. Als Zellzyklus-Inhibitoren kommen Zyklinkinase-Inhibitoren wie insbesondere der Zyklinkinase-Inhibitor P27Kipl in Frage.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| AL       | Albanien                     | ES . | Spanien                     | LS | Lesotho                     | SI | Slowenien              |
|----------|------------------------------|------|-----------------------------|----|-----------------------------|----|------------------------|
| AM       | Armenien                     | FI   | Finnland                    | LT | Litauen                     | SK | Slowakei               |
| AT       | Österreich                   | FR   | Frankreich                  | LU | Luxemburg                   | SN | Senegal                |
| AU       | Australien                   | GA   | Gabun                       | LV | Lettland                    | SZ | Swasiland              |
| AZ       | Aserbaidschan                | GB   | Vereinigtes Königreich      | MC | Monaco                      | TD | Tschad                 |
| BA       | Bosnien-Herzegowina          | GE.  | Georgien                    | MD | Republik Moldau             | TG | Togo                   |
| BB       | Barbados                     | GH   | Ghana                       | MG | Madagaskar                  | TJ | Tadschikistan          |
| BE       | Belgien                      | GN   | Guinea                      | MK | Die ehemalige jugoslawische | TM | Turkmenistan           |
| BF       | Burkina Faso                 | GR   | Griechenland                |    | Republik Mazedonien         | TR | Türkei                 |
| BG       | Bulgarien                    | HU   | Ungarn                      | ML | Mali                        | TT | Trinidad und Tobago    |
| BJ       | Benin                        | IE   | Irland                      | MN | Mongolei                    | UA | Ukraine                |
| _        | Brasilien                    | IL   | Israel                      | MR | Mauretanien                 | UG | Uganda                 |
| BR<br>BY |                              | IS   | Island                      | MW | Malawi                      | US | Vereinigte Staaten von |
|          | Belarus                      | IT   | Italien                     | MX | Mexiko                      |    | Amerika                |
| CA       | Kanada                       | JP   | Japan                       | NE | Niger                       | UZ | Usbekistan             |
| CF       | Zentralafrikanische Republik | KE   | Kenia                       | NL | Niederlande                 | VN | Vietnam                |
| CG       | Kongo                        | KG   | Kirgisistan                 | NO | Norwegen                    | YU | Jugoslawien            |
| CH       | Schweiz                      | KP   | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland                  | zw | Zimbabwe               |
| CI       | Côte d'Ivoire                | KF   | Korea                       | PL | Polen                       |    |                        |
| СМ       | Kamerun                      | T/D  | Republik Korea              | PT | Portugal                    |    |                        |
| CN       | China                        | KR   | Kasachstan                  | RO | Rumānien                    |    |                        |
| CU       | Kuba                         | KZ   |                             | RU | Russische Föderation        |    |                        |
| CZ       | Tschechische Republik        | LC   | St. Lucia                   | SD | Sudan                       |    |                        |
| DE       | Deutschland                  | LI   | Liechtenstein               | SE | Schweden                    |    |                        |
| DK       | Dänemark                     | LK   | Sri Lanka                   | SC |                             |    |                        |
| EE       | Estland                      | LR   | Liberia                     | 30 | Singapur                    |    |                        |

Intern I Application No PCT/EP 99/01153

| A. CLASSI    | FICATION OF SUBJECT MATTER A61K38/00  | 1   | <del></del>   |
|--------------|---|---|---|
| 1100         | A01K36/00   |   | •   |
|              |   | • • • •                                   |   |
|              | o International Patent Classification (IPC) or to both national classification                | ation and IPC                             |   |
|              | SEARCHED cumentation searched (classification system followed by classification)              |   | ٠   |
| IPC 6        | A61K  | on symbols)                               |   |
|              |   |   | documents are included in the fields searched  It passages Relevant to claim No.  R S 1-6,8, 10, 20-23, 28,29  It aims  Patent family members are listed in annex.  ater document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cled to understand the principle or theory underlying the invention cannot be considered to invention and the considered to invention the considered to invention the considered to invention the considered to invention and the considered to invention the considered to invention the considered to invention the considered to involve an invention step when the document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an invention step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the an.  Jocument member of the same patent family.  Date of mailing of the international search report  20/12/1999  Authorized officer |
| Documenta    | ion searched other than minimum documentation to the extent that s                            | uch documents are included in the fields  | teatrohad   |
|              | #X  | and the metas s                           | searched .  |
| Electronic d | ata base consulted during the international search (name of data base                         | se and, where practical, search terms use | d) .  |
|              |   |   |   |
|              |   |   |   |
|              |   | •   |   |
| C. DOCUM     | ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |   |
| Category °   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele                         | evant passages                            | Belevant to claim No  |
|              |   | ·   | Helevani to dalin 140.  |
| X,P          | WO 98 13048 A (NAVARATNAN DHASAKU   | IMAR S                                    | 1-6.8   |
|              | ;UNIV PENNSYLVANIA (US); OBERHOLT   |   |   |
|              | CAR) 2 April 1998 (1998-04-02)  |   | 20-23,  |
| ·            | abstract  |   | 28,29   |
|              | page 2, line 10 -page 4, line 23  |   | ,   |
|              | page 6, line 24-30  |   |   |
|              | page 7, line 16 -page 8, line 22;   | claims                                    |   |
|              | 1-20; examples 1-4  |   |   |
|              | _   | /   |   |
|              |   |   |   |
|              |   |   |   |
|              |   | • •                                       |   |
|              |   |   |   |
|              |   | . •                                       |   |
|              |   |   |   |
|              | ,   |   |   |
| X Funt       | ner documents are listed in the continuation of box C.  | X Patent family members are listed        | in annex.   |
| ° Special ca | egories of cited documents:   | TT leter d                                |   |
| "A" docume   | nt defining the general state of the art which is not   | or priority date and not in conflict with | the application but   |
| 1            | ered to be of particular relevance  Ocument but published on or after the international       | invention                                 | . , ,   |
| filing d     | ate nt which may throw doubts on priority claim(s) or   | cannot be considered novel or cannot      | t be considered to  |
| which        | e cited to establish the nublication data at access.  | "Y" document of particular relevance; the | claimed invention   |
|              | ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or                                       | document is combined with one or m        | ore other such docu-  |
| "P" docume   | nt published prior to the international filing date but                                       | in the art.                               | •   |
| ļ            | actual completion of the international search   |   |   |
|              | ·   | Date of mailing of the international se   | earch report  |
|              | December 1999   | 20/12/1999                                |   |
| Name and n   | nailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2                  | Authorized officer                        |   |
|              | NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | A. Jakobs                                 |   |
| L            | . ,   |   | '   |

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

Intern: al Application No PCT/EP 99/01153

| Category * | Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages  |                                  |
|------------|--|----------------------------------|
| Р,Х        | CHEN, P. ET AL: "p27/Kip1, a cyclin<br>-dependent kinase inhibitor, is required<br>for the normal development of the mouse   | 1-29                             |
|            | auditory sense organ."  SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998)  VOL. 24, NO. 1-2, PP. 809. MEETING INFO.:  28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR  NEUROSCIENCE, PART 1 LOS ANGELES,  CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998  SOCIETY FOR NEUROSCIENCE., XP002123936  abstract      |                                  |
| <b>X</b>   | WO 98 00014 A (LALWANI ANIL ;UNIV CALIFORNIA (US); SCHINDLER ROBERT A (US)) 8 January 1998 (1998-01-08) the whole document   | 1-29                             |
| X          | WO 97 22255 A (DANA FARBER CANCER INST INC; SHIN JAEKYOON (US); JOUNG INSIL (US);) 26 June 1997 (1997-06-26) page 20, line 3-28 page 53, line 4-22   | 22-25                            |
| <b>x</b>   | SCHWEITZER V G: "Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents."  LARYNGOSCOPE, (1993 APR) 103 (4 PT 2) 1-52. REF: 151 , XP002123937 abstract  | 1-6,8,<br>10,<br>20-23,<br>28,29 |
| X          | UMEMOTO M ET AL: "HAIR CELL REGENERATION IN THE CHICK INNER EAR FOLLOWING ACOUSIC TRAUMA: ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES" CELL AND TISSUE RESEARCH, DE, BERLIN, vol. 3, page 435-443 XP002060017 page 441, column 1, paragraph 7 -page 442, column 2, paragraph 2   | 1-6,<br>8-10,<br>20-25           |
| X          | WO 97 17983 A (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE INC; UNIV VIRGINIA (US); E K SHRIVER CENTER) 22 May 1997 (1997-05-22) abstract page 6, line 1 -page 7, line 8 page 10, line 12 -page 12, line 9 page 16, line 27 -page 17, line 9 page 18, line 1 -page 31, line 20; claims 1-28; examples 1-6 | 1-29                             |
| A          | BUJIA J. ET AL: "Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma." EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY, (1996) 253/1-2 (21-24). , XP002123938   | 1-29                             |

Intern: al Application No
PCT/EP 99/01153

| .(Continu | tion) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT   |                       |  |
|-----------|---|-----------------------|--|
| ategory ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |  |
| . :       | YAMAGUCHI T ET AL: "The effect of chalone on the cell cycle in the epidermis during wound healing." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, (1974 DEC) 89 (2) 247-54., XP002123939 the whole document | 1-29                  |  |
| (,P       | WO 99 06064 A (AMGEN INC) 11 February 1999 (1999-02-11) abstract page 9, line 20 -page 11, line 10 page 12, line 1 -page 53, line 9; claims 1-40; examples 1-4                            | 1-29                  |  |
|           |   |                       |  |
|           |   | •                     |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   | ,                     |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   |                       |  |
|           |   | ·                     |  |

International application No. PCT/EP 99/01153

| Box 1     | Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)  |
|-----------|--|
| This inte | mational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:   |
| 1. [X     | Claims Nos.: 1, 4-21 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  |
| bo        | oservation: Although Claims 1, 4-21 relate to a method for treatment of the human/animal ody, the search was carried out and was based on the cited effects of the ampound/composition.                                      |
| 2. X      | Claims Nos.: - because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: |
|           | See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210   |
| 3.        | Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).   |
| Box II    | Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)   |
| This Int  | ternational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:   |
|           |  |
|           |  |
|           |  |
|           |  |
| 1.        | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.   |
| 2.        | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.   |
| 3.        | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:                         |
|           |  |
|           |  |
| 4.        | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:             |
| Rem       | ark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  No protest accompanied the payment of additional search fees.   |
|           | No protest accompanies die payment of destination  |

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

International application No. PCT/EP99/01153

#### Continuation of Box I.2

Patent claims 1-29 relate to a product/utilization which are defined (inter alia) by the following parameters:

P1: active substance inhibiting or suppressing the effectiveness of at least one cell cycle inhibitor

P2: active substance inhibiting or suppressing the effectiveness of at least the cell cycle inhibitor cyclin-dependent kinase inhibitor

P3: active substance inhibiting or suppressing the effectiveness of at least the cell-cycle inhibitor cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kipl.

In the present context, the use of said parameter appears to be lacking in clarity as defined by PCT Art. 6. It is impossible to compare the parameter chosen by the applicant with relevant disclosures in prior art. The lack of clarity is such that no meaningful search is deemed possible. It is indicated in page 9 of the description that the active substance may be selected or developed for instance by choosing a binding site between p27Kipl and cyclin A or p27Kipl and CDK2 in which no binding/interaction with high or very high affinity is present in order to select or develop said active substance, preferably in the form of an additional peptide/protein in such a way that binding/interaction is achieved with one of both interaction partners on the corresponding binding site with at least the same high or preferably higher affinity so as to obtain the physiological effect (treatment of diseases and disorders of the inner ear). A more detailed technical solution or structural transcription of the active substance(s) for which patent protection is sought in claims 1-29 is not provided. Moreover, the International Searching Authority is of the opinion that it is not the task of the public to select or develop the active substances covered by the protection sought for by the present application. For this reason, the search was limited to the examples/compounds and to the compounds which possibly solve the present task and wherever possible to the alleged mode of action indicated in the patent claims.

Form PCT/ISA/210

International application No.

PCT/EP99/01153

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

Form PCT/ISA/210

....Jrmation on patent family members

Interna al Application No PCT/EP 99/01153

| Patent document cited in search report |     | Publication date |          | Patent family member(s) |     | Publication date         |
|--|-----|------------------|----------|-------------------------|-----|--------------------------|
| WO 9813048                             | Α   | 02-04-1998       | AU       | 4600297                 | Α.  | 17-04-1998               |
| WO 9800014                             | Α   | 08-01-1998       | AU       | 3591597                 | Ā   | 21-01-1998               |
| WO 9722255                             | Α - | 26-06-1997       | US<br>AU | 5962224<br>1291197      |     | 05-10-1999<br>14-07-1997 |
| WO 9717983                             | Α   | 22-05-1997       | AU<br>EP | 7725896<br>0866716      |     | 05-06-1997<br>30-09-1998 |
| WO 9906064                             | A   | 11-02-1999       | AU       | 8658298                 | Α . | 22-02-1999               |

Form PCT/ISA/210 (patent lamily annex) (July 1992)

Intern tales Aktenzeichen PCT/EP 99/01153

| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  |   |
|--|---|
| IPK 6 A61K38/00  | ·   |
|  |   |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifik   | ation und der IPK   |
| B RECHERCHIERTE GEBIETE  |   |
| Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  |   |
| IPK 6 A61K   |   |
| Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit   | diese unter die recherchierten Gebiete fallen   |
| Recherchierte aber nicht zum Mindestpruiston genorende Verönermonigen, sonner  |   |
|  | de Catachanik und outli verwendete Suchbegriffe)  |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name   | o der Datermank und evil. Vernomene Casa-S  |
|  |   |
| ·  | ·   |
|  |   |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  | Cott Apparent Nr.   |
| Kategorie' Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe de   | er in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr.   |
|  | 1-6,8,  |
| X,P WO 98 13048 A (NAVARATNAN DHASAKUMA<br>;UNIV PENNSYLVANIA (US); OBERHOLTZE   | 111.  |
| CAR) 2. April 1998 (1998-04-02)  | 1 . == == ,   |
|  | 28,29   |
| Zusammenfassung<br>Seite 2, Zeile 10 -Seite 4, Zeile   | 23  |
| 1  | i i   |
| Seite 7. Zeile 16 -Seite 8, Zeile  | 22;   |
| Ansprüche 1-20; Beispiele 1-4  | ·   |
| -/   |   |
|  |   |
|  |   |
|  |   |
|  |   |
|  |   |
|  |   |
|  |   |
| Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu  | X Siehe Anhang Patentfamilie  |
| entnehmen  | 20 The Marking die nach dem internationalen Anmeldedatum  |
| Besondere Kategorien von angegebenen Verander Besondere Be | oder dem Prioritalsdatum veröffertillett worder ist and in des der  |
| aber nicht als besonders bedeutsam anzusenen ist   | Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der mit zugrundenegenden.   |
| Anmeldedatum veroffentlicht worden ist   | X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erlindung<br>kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf<br>veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beansprucht als neu oder auf<br>kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf |
| scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichung belegt werden  | erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet.  Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung   |
| soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (ind  | kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet<br>werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen<br>Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und   |
| "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,   | diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist   |
| "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Affinierdeductiff, abst has in dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist   | "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist  Absendedatum des internationalen Recherchenberichts   |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  | Absendedatum des internationalen necheronomosika  |
| 6. Dezember 1999   | 20/12/1999  |
|  | Bevollmächtigter Bediensteter   |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde<br>Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2   |   |
| NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  | A. Jakobs   |
| Fax: (+31-70) 340-3016   |   |

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

Interr lales Aktenzeichen
PCT/EP 99/01153

|                        |   | PCT/EP 9   | 9/01153                          |
|------------------------|---|------------|----------------------------------|
|                        | ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN   |            |                                  |
| Kategorie <sup>3</sup> | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme  | nden Teile | Betr. Anspruch Nr.               |
| P,X                    | CHEN, P. ET AL: "p27/Kip1, a cyclin -dependent kinase inhibitor, is required for the normal development of the mouse auditory sense organ."  SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998) VOL. 24, NO. 1-2, PP. 809. MEETING INFO.: 28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, PART 1 LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE., XP002123936 Zusammenfassung |            | 1-29                             |
| X .                    | WO 98 00014 A (LALWANI ANIL ;UNIV<br>CALIFORNIA (US); SCHINDLER ROBERT A (US))<br>8. Januar 1998 (1998-01-08)<br>das ganze Dokument   |            | 1-29                             |
| <b>X</b> .             | WO 97 22255 A (DANA FARBER CANCER INST INC; SHIN JAEKYOON (US); JOUNG INSIL (US);) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Seite 20, Zeile 3-28 Seite 53, Zeile 4-22   |            | 22-25                            |
| X                      | SCHWEITZER V G: "Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents."  LARYNGOSCOPE, (1993 APR) 103 (4 PT 2) 1-52. REF: 151 , XP002123937  Zusammenfassung   |            | 1-6,8,<br>10,<br>20-23,<br>28,29 |
| X                      | UMEMOTO M ET AL: "HAIR CELL REGENERATION IN THE CHICK INNER EAR FOLLOWING ACOUSIC TRAUMA: ULTRASTRUCTURAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES" CELL AND TISSUE RESEARCH, DE, BERLIN, Bd. 3, Seite 435-443 XP002060017 Seite 441, Spalte 1, Absatz 7 -Seite 442, Spalte 2, Absatz 2  |            | 1-6,<br>8-10,<br>20-25           |
| X                      | WO 97 17983 A (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE INC; UNIV VIRGINIA (US); E K SHRIVER CENTER) 22. Mai 1997 (1997-05-22) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 1 -Seite 7, Zeile 8 Seite 10, Zeile 12 -Seite 12, Zeile 9 Seite 16, Zeile 27 -Seite 17, Zeile 9 Seite 18, Zeile 1 -Seite 31, Zeile 20; Ansprüche 1-28; Beispiele 1-6  |            | 1-29                             |
| A                      | BUJIA J. ET AL: "Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma." EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY, (1996) 253/1-2 (21-24)., XP002123938   |            | 1-29                             |
|                        | -/  |            |                                  |

Intern lales Aktenzeichen
PCT/EP 99/01153

| Kategorie* | ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN  Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden  | Teile Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------------|
| Α          | YAMAGUCHI T ET AL: "The effect of chalone on the cell cycle in the epidermis during wound healing." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, (1974 DEC) 89 (2) 247-54., XP002123939 das ganze Dokument | 1-29                     |
| X , P      | WO 99 06064 A (AMGEN INC) 11. Februar 1999 (1999-02-11) Zusammenfassung Seite 9, Zeile 20 -Seite 11, Zeile 10 Seite 12, Zeile 1 -Seite 53, Zeile 9; Ansprüche 1-40; Beispiele 1-4         | 1-29                     |
|            |   |                          |
|            |   |                          |
|            |   |                          |
|            |   |                          |
| -          |   |                          |
|            |   |                          |
|            |   |                          |
|            |   |                          |
|            |   |                          |
|            |   |                          |

Int...ationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/01153

| Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)   |
|--|
| Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:   |
| 1. $\overline{\text{X}}$ Ansprüche Nr. $1$ , $4-21$ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich   |
| Bemerkung: Obwohl die Anspruche 1, 4-21<br>sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen<br>Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich<br>auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.  |
| 2. X Ansprüche Nr. – weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  |
| Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210  |
|  |
| 3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.  |
| g g and a g an |
| Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)   |
| Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:   |
|  |
|  |
|  |
|  |
| Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.  |
| 2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.   |
|  |
| 3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.  |
|  |
| 4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recher-chenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  |
|  |
|  |
| Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.   |
| Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.   |

#### PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-29 sind auf ein Produkt/Verwendung, das (u.a.)

mittels folgender Parameter definiert wird, zu beziehen:

P1: Wirkstoff der mindestens einen Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung hemmt oder ausschaltet.

P2: Wirkstoff der mindesten den Zellzyklus-Inhibitor

Zyklinkinase-Inhibitor in seiner Wirkung hemmt oder ausschaltet.

P3: Wirkstoff der mindesten den Zellzyklus-Inhibitor

Zyklinkinase-Inhibitor p27Kip1 in seiner Wirkung hemmt oder ausschaltet.

Die Verwendung dieser Parameter muss im gegebenen Zusammenhang als Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT erscheinen. Es ist unmöglich, die vom Anmelder gewählten Parameter mit dem zu vergleichen, was der Stand der Technik hierzu offenbart. Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht. Auf Seite 9 der Beschreibung wird angegeben das der Wirkstoff zum Beispiel wie folgt ausgewählt oder entwickelt werden kann nämlich indem man z.B. eine der Bindungstellen zwischen p27kip1 und Zyklin A bzw. p27Kip1 und CDK2, an der keine Bindung/Interaction mit hoher oder sehr hoher Affinität vorliegt, herausgreift um besagte Wirkstoffe, vorzugsweise in Form eines weiteren Peptids/Proteins derart auszuwählen oder zu entwickeln so dass mit einem der beiden Wechselwirkungspartner an der betreffenden Bindungsstelle eine Bindung/Interaktion mindestens gleich hoher oder vorzugsweise höherer Affinität eingegangen wird um die physiologische Wirkung (Behandlung von Erkrankungen und Störungen des Innenohrs) zu erreichen. Eine nähere technische Lösung, oder strukturelle Umschreibung des oder der Wirkstoffe(s) für die in Ansprüchen 1-29 Patenschutz angefragt wird, ist nicht gegeben. Weiterhin ist die Internationale Recherchenbehörde der Meinung, daß es nicht die Aufgabe der Öffentlichkeit ist, die Wirkstoffe auszuwählen oder zu entwickeln die unter das Schutzbegehren der vorliegenden Anmeldung fallen. Daher wurde die Recherche beschränkt auf die Ausführungsbeispiele/Verbindungen, und Verbindungen die möglicherweise die vorliegende Aufgabe lösen, und soweit möglich ausgebreitet auf die vermeintliche Wirkungsweise die in den Patentansprüchen angegeben ist.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

Angaben zu Veröffentlichunge... die zur selben Patentfamilie gehören

Interna les Aktenzeichen
PCT/EP 99/01153

| Im Recherchenberich<br>angeführtes Patentdokui |   |            |            |                        |                          | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|------------|------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| WO 9813048                                     | Α | 02-04-1998 | AU         | 4600297 A              | 17-04-1998               |                               |
| WO 9800014                                     | A | 08-01-1998 | AU         | 3591597 A              | 21-01-1998               |                               |
| WO 9722255                                     | Α | 26-06-1997 | US ·<br>AU | 5962224 A<br>1291197 A | 05-10-1999<br>14-07-1997 |                               |
| WO 9717983                                     | Α | 22-05-1997 | AU<br>EP   | 7725896 A<br>0866716 A | 05-06-1997<br>30-09-1998 |                               |
| WO 9906064                                     | Α | 11-02-1999 | AU         | 8658298 A              | 22-02-1999               |                               |

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

# **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

| □ BLACK BORDERS   |
|---|
| ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES                 |
| FADED TEXT OR DRAWING                                   |
| ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING                  |
| ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES                                 |
| ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS                  |
| ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS                                  |
| ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT                   |
| ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY |
| Потивр.   |

# IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.